

珍珠鸟和家鸡甲状旁腺激素 3 型受体 (PTH3R) 的结构与表达图谱分析

高顺玉^{1,2}, 何晨¹, 程绍臣¹, 李娟¹, 王亚军¹

(1. 四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064;

2. 楚雄师范学院化学与生命科学学院, 楚雄 675000)

摘要: 本研究采用 RT-PCR 方法, 首先克隆珍珠鸟和家鸡的 PTH3R 基因全长 cDNA 序列. 结果显示, 家鸡 PTH3R (*cPTH3R*) cDNA 全长 1632 bp, 编码 543 个氨基酸, 珍珠鸟 PTH3R (*zPTH3R-w*) cDNA 序列全长 1563 bp, 编码 520 个氨基酸, 其蛋白均含有信号肽序列、七次跨膜区等特征性结构. 此外, 在珍珠鸟中还发现一个新剪接变体 *zPTH3R-v1*, 其 cDNA 序列全长 1468 bp, 编码 488 个氨基酸, 其缺失第 3 外显子进而导致第 1 跨膜结构域缺失. 利用生物信息学方法, 我们还对珍珠鸟和家鸡 PTH3R 蛋白序列进行三维建模. 采用 RT-PCR 方法, 本研究也对珍珠鸟 PTH3R 基因进行组织表达分析. 结果显示, *zPTH3R* 及其剪切变体 *zPTH3R-v1* 在珍珠鸟脑及外周组织中广泛表达.

关键词: 家鸡; 珍珠鸟; PTH3R; 分子克隆; 结构分析; 剪接变体; 组织表达

中图分类号: Q452 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)06-1361-08

Characterization of Type 3 parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor in chickens and zebra finches

GAO Shun-Yu^{1,2}, HE Chen¹, CHENG Shao-Chen¹, LI Juan¹, WANG Ya-Jun¹

(1. Key laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, 610064, China;

2. College of Chemistry and Life Sciences, Chuxiong Normal University, Chuxiong, 675000, China)

Abstract: The aim of this study was to clone the cDNA sequence of the chicken and zebra finch PTH3R and further analyze the tissue expression of zebra finch PTH3R. Result showed that chicken PTH3R (*cPTH3R*) cDNA is 1632 bp in length and encodes a 543-amino acid receptor; zebra finch PTH3R (*zPTH3R-w*) cDNA is 1563 bp in length and encodes a 520-amino acid receptor. Both *cPTH3R* and *zPTH3R-w* contain a signal peptide and seven transmembrane domains. A new splice variant of *zPTH3R*, named *zPTH3R-v1*, was also cloned in this study. It is 1468 bp in length and encodes a 488-amino acid receptor. The *zPTH3R-v1* lacks the 3rd exon which codes for the 1st transmembrane domain. RT-PCR assay showed that *zPTH3R-w* mRNA is expressed in all tissues examined except kidney, thyroid gland, pancreas, pituitary and spinal cord, while *zPTH3R-v1* mRNA is expressed in all peripheral tissue and central neuronal system tissues except cerebellum.

Keywords: Chicken; Zebra finch; PTH3R; Molecular cloning; Structural analysis; Splice variant

1 引言

甲状旁腺激素家族(parathyroid hormone family)与钙稳态调控和骨代谢平衡相关,并经由 Ca^{2+} 的介导而参与多种组织,如心脏、乳腺和免疫系统等的发育调控^[1-3],其家族成员主要有甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)、甲状旁腺激素相关肽(PTH-related peptide, PTHrP)和甲状旁腺激素类似肽(PTH-like peptide, PTH-L)。这些肽类激素均可通过结合其相应受体,调节这些生理过程^[2-3]。

甲状旁腺激素受体(Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor, PTHRs)属于G蛋白偶联受体家族(G protein-coupled receptors)^[1,4-6],目前已报导的家族成员有PTH1R、PTH2R和PTH3R。其中,PTH1R在哺乳动物、两栖动物和硬骨鱼等多种脊椎动物中都已克隆鉴定到,其特异性配体为PTH和PTHrP^[4-12];PTH2R在哺乳动物和硬骨鱼中已克隆鉴定到,但在鸟类中还没有鉴定到,其特异性配体为PTH^[13-15];PTH3R在鱼类中已经被鉴定到,其特异性配体可能是PTHrP和PTH-L^[3,16-19],并在硬骨鱼肾脏组织中检测到较高水平的基因表达^[20]。

PTH3R在家鸡胚胎26HH阶段前持续高表达,在36HH阶段仅在家鸡胚胎躯体部检测到高表达而在头部中未检测出;成体家鸡中,PTH3R仅在肠、肺和软骨等少数组织中有低水平表达^[3]。到目前为止,PTH3R在鸟类中的研究还相对较少,因此,本文以珍珠鸟和家鸡为研究对象,旨在克隆珍珠鸟和家鸡PTH3R基因,并利用生物信息学方法分析其序列结构及三维建模,为进一步研究PTH3R在鸟类中的作用奠定基础。

2 材料与方法

2.1 材料试剂

家鸡(chicken, *Gallus gallus*)与珍珠鸟(zebra finch, *Taeniopygia guttata*)购自成都本地市场。基因克隆中的宿主菌*E. coli* DH5 α 由本实验室自行制备保存。RNAzol由Cincinnati的Molecular Research Central生产。反转录PCR试剂盒(MMLV kit)购买于TaKaRa公司。克隆载体pTA-2连接试剂盒、高保真PCR反应试剂盒(KOD-Fx kit)购自TOYOBO公司。限制性内切酶

体系、T4 DNA连接酶体系、Easy Taq酶PCR体系均购自TAKARA公司。PCR引物由成都金杰生物公司合成。核酸测序由北京华大六和股份有限公司完成。

2.2 方法

2.2.1 珍珠鸟和家鸡甲状旁腺组织总RNA提取

取适量珍珠鸟和家鸡甲状旁腺加入600 μL RNAzol中,充分研磨后按试剂盒使用说明进行组织总RNA的提取。其步骤简述如下:往研磨液中加入240 μL 焦碳酸二乙酯处理过的超纯水(DEPC- H_2O)涡旋混匀,室温静置15min后12000g离心15min。取600 μL 上清入新离心管中并加入3 μL 对溴苯甲醚溶液(4-bromoanisole, BAN)涡旋混匀,静置5min后12000g离心10min。取上清入新离心管,并随即加入等体积的异丙醇,颠倒混匀后冰上静置沉淀20min,12000g离心15min收集沉淀。75%乙醇溶液清洗沉淀2次后,晾干,适量DEPC- H_2O 溶解沉淀,即得到组织总RNA溶液。使用2%琼脂糖凝胶电泳检测所提取组织总RNA的完整性,并使用BioPhotometer 6131型核酸蛋白定量仪测定RNA溶液浓度。

2.2.2 反转录PCR 以提取甲状旁腺组织总RNA为模板,按照TaKaRa反转录试剂盒(M-MLV kit)使用说明两步法制备甲状旁腺组织cDNA模板。其步骤简述如下:配制Mixture 1(2 μg RNA,1 μL oligdT,加入DEPC- H_2O 补足5 μL),70 $^{\circ}\text{C}$ 反应10min后冰上静置2min。然后加入5 μL Mixture 2(2 μL 5 \times Buffer,0.5 μL 10mM dNTP,0.5 μL MMLV,2 μL DEPC- H_2O),42 $^{\circ}\text{C}$ 反应90min,之后70 $^{\circ}\text{C}$ 加热10min,再向反应液中加入50 μL MilliQ- H_2O 混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,作为cDNA模板。

2.2.3 甲状旁腺激素受体编码区的克隆 以甲状旁腺组织cDNA为模板,根据高保真PCR反应试剂盒(KOD-Fx kit)试剂盒说明,进行甲状旁腺激素受体基因编码序列的扩增。

PCR反应体系为:2 \times KOD缓冲液5 μL ;cDNA模板1 μL ;2mM dNTPs 2 μL ;基因特异性扩增引物(cPTH3R-rU2/rL2, zPTH3R-rU1/rL2。见表1)各0.1 μL (终浓度20 $\mu\text{mol/L}$);KOD-Fx聚合酶(1U/ μL) 0.5 μL ;DMSO(100%)0.6 μL ;MilliQ- H_2O 补足10 μL 总反应液体积。

PCR扩增反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2min;98 $^{\circ}\text{C}$ 变性10s,64 $^{\circ}\text{C}$ 退火30s,68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸9min,35个循环;

72℃最后延伸 20 min. 然后分别取 3 μ L 反应产物用 1.5 % 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

对 PCR 产物进行加 A 反应, 反应体系为: PCR 产物 4.5 μ L, 10 \times A-attachment Mix 0.5 μ L, 反应条件为 60℃ 加热 1 hr. 将加 A 后的 PCR 产物进行 TA 连接, 反应体系为: 加 A 后反应液 1.5 μ L, 2 \times Ligation Buffer 2.5 μ L, pTA2 载体 0.5 μ L, T4 DNA 连接酶 0.5 μ L, 总反应液体积 5 μ L.

将 TA 连接产物转化宿主菌 *E. coli* DH5 α , 然后利用 pTA-2 载体通用引物(T3/T7)和基因特异性引物(cPTH3R-U2/L2, zPTH3R-rU1/L2. 见表 1) 进行菌落 PCR 筛选, 将筛选到的阳性克隆进行质粒提取, 最后选取阳性克隆进行双向序列测定。

2.2.4 珍珠鸟甲状旁腺激素受体基因组织表达分析 根据 NCBI 公布的 β -actin 序列(Accession: NM_205518.1)设计特异性引物扩增内参基因. 根据 Ensembl 基因组数据库中珍珠鸟基因组序列及克隆所得的序列信息设计 zPTH3R 和 cPTH3R 基因特异性引物, 利用不同的引物组合检测 PTH3R 在各组织中的表达分布情况, 设计的引物均位于不同的外显子上以排除基因组 DNA 的干扰, 引物详细信息见表 1.

表 1 PTH3R PCR 扩增引物序列

Tab. 1 Primer sequences of PTHR

| 引物名称 Primer name | 引物序列 5' \rightarrow 3' Primer sequences (5' to 3') |
|---------------------|---|
| cPTH3R-rU1 | 5'-CGG <u>ggta</u> CCATCCCTCGCTGGCTC-CGT-3' |
| cPTH3R-rL1 | 5'-CCG <u>gaat</u> TCCAGCTGGGAGATG-CAGTGT-3' |
| cPTH3R-U2 | 5'-GATCCTGACGATGTTCTCACT-3' |
| cPTH3R-L2 | 5'-AGGATGCAGACAGCTACGAT-3' |
| zPTH3R-rU1 | 5'-CGG <u>ggta</u> CCATCCGAGTGACACGGT-GGCA-3' |
| zPTH3R-rL1 | 5'-CCG <u>gaat</u> TCCACCCTCCGCTTCACAG-CAT-3' |
| zPTH3R-L2 | 5'-ACATGAGGTGCAGGCGGTCA-3' |
| β -actin-U1 | 5'-TGTGCTACGTCGACTGGAT-3' |
| β -actin-L1 | 5'-GCTGATCCACATCTGCTGGA-3' |

注: 下划线表示设计引物时添加的限制性内切酶的酶切位点。

Note: The restriction enzyme sites added to primers are underlined

PCR 反应体系为: 10 \times Easy-Taq 缓冲液 1 μ L; cDNA 模板 2 μ L; 10 mM dNTPs 0.2 μ L; 基因特异性扩增引物(zPTH3R-rU2/rL1, zPTH3R-

rU1/L2. 见表 1)各 0.1 μ L (终浓度 20 μ mol/L); Easy-Taq 聚合酶(5U/ μ L) 0.1 μ L; DMSO(100%) 0.6 μ L; MilliQ-H₂O 补足 10 μ L 总反应液体积。

PCR 反应过程: 94℃ 预变性 2min; 94℃ 变性 30s, 退火 30s (zPTH3R: 60℃; β -actin: 58℃), 72℃ 延伸 (引物对 zPTH3R-rU1/ rL1: 90s; zPTH3R-rU1/ L2: 45s; β -actin-U1/L1: 30s), 扩增 zPTH3R 循环数为 33, 扩增 β -actin 为 23 个循环; 循环结束后 72℃ 充分延伸 5min.

反应结束后的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2.5 序列比对和分析 对测序结果采用 Laser-gene 中的 SeqMan 和 EditSeq 软件对测序结果拼接. 利用 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ensembl 基因组数据库 (<http://www.ensembl.org/index.html>) 和 DNAMAN v8.0 软件 (by Lynnon Biosoft), 对测序结果与基因组序列进行比对. 蛋白质跨膜区分析通过 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), TMPred Server (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 和 DNAMAN v8.0 软件进行综合评价. 信号肽预测通过 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 DNAMAN v8.0 软件分析. 蛋白糖基化位点通过 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测. 蛋白激酶特异磷酸化位点通过 NetPhosK 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) 预测. 蛋白三维结构通过 SWISS-MODEL 网站 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行同源建模, 并采用 PyMOL v1.7 软件 (by Schrödinger) 解析并绘图。

3 结果

3.1 甲状旁腺激素受体基因序列扩增

以 zPTH3R-rU1/zPTH3R-rL1 为上下游引物, 珍珠鸟脑组织来源 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后结果如图 1-a 所示. 扩增得到的主条带与预测的 1554 bp 接近. 将该片段与 pTA2 载体连接后转化到宿主菌 *E. coli*. DH5 α 中, 之后选取阳性克隆测序, 经鉴定正确的阳性质粒进行测序, 至少通过 3 个不同的阳性克隆验证序列的一致性。

以 cPTH3R-rU1/cPTH3R-rL1 为上下游引

物,家鸡脑组织来源 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后结果如图 1-b 所示. 扩增得到的主条带与预测的 1629 bp 接近. 将该片段与 pTA2 载体连接后转化到宿主菌 *E. coli*. DH5 α 中,并选取阳性克隆测序,经鉴定正确的阳性质粒进行测序,至少通过 3 个不同的阳性克隆验证序列的一致性.

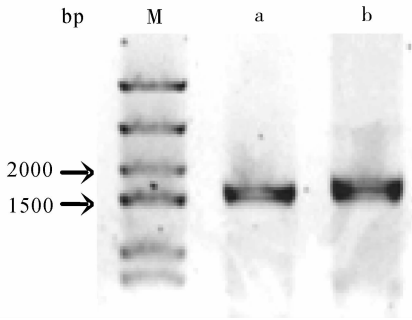


图 1 珍珠鸟及家鸡甲状旁腺激素受体编码区序列 PCR 扩增结果

a) 珍珠鸟 PTH3R; b) 家鸡 PTH3R; M, DNA marker

Fig. 2 PCR amplification of PTH3R coding sequence

a) PCR product of zebra finch PTH3R; b) PCR product of chicken PTH3R cDNA; M, DNA marker

3.2 PTH3R 基因结构分析

分析测序结果和 Ensembl 数据库分别 Blast 比对珍珠鸟和家鸡基因组序列,证实我们克隆到的珍珠鸟 PTH3R 和家鸡 PTH3R 编码区核苷酸序列定位于各自 27 号染色体, zPTH3R cDNA 序列全长 1563 bp, cPTH3R cDNA 序列全长 1632 bp. 我们测到的珍珠鸟 PTH3R 序列与家鸡 PTH3R cDNA 序列一致性达 80.96%; 与已鉴定到的斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 PTH3R cDNA 序列 (GenBank 登录号: AF132085.2) 一致性达 62.04%.

珍珠鸟和家鸡 PTH3R 基因均由 13 个外显子构成,本文中将其编码区的外显子依序命名为 Exon 1、Exon 2……Exon 13. 经比对发现, Exon 1 主要负责编码信号肽, Exon 5-8 主要负责编码 TM1-4 及其间的连接肽段, Exon 10-12 主要负责编码 TM5-7 及其间的连接肽段 (图 2).

在本次克隆珍珠鸟 PTH3R 的过程中,我们也鉴定到一个 zPTH3R 的剪接变体,命名为 zPTH3R-v1, 全长 1468 bp. 测序比对发现 zPTH3R-v1 除缺失了第 3 外显子序列之外,其余序列与 zPTH3R 序列一致.

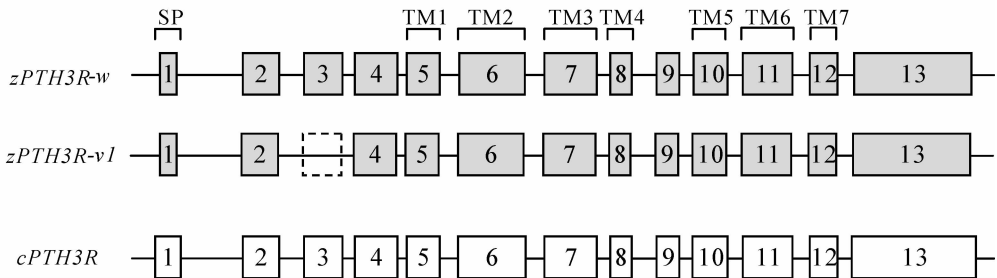


图 2 珍珠鸟和家鸡 PTH3R 基因结构

实线方框及数字代表外显子区及其编号,虚线框代表缺失的外显子,横线表示内含子区. zPTH3R-w 代表本文中克隆并测序到的珍珠鸟 PTH3R (1563bp); zPTH3R-v1 代表本文中克隆并测序到的珍珠鸟 PTH3R 的一种剪接变体形式 (1468 bp); cPTH3R 代表本文中克隆并测序到的家鸡 PTH3R.

Fig. 2 Gene structure of zebra finch and chicken PTH3R

zPTH3R-w indicates the cloned zebra finch PTH3R (1563 bp); zPTH3R-v1 means the splice variant of zebra finch PTH3R (1468 bp). cPTH3R means chicken PTH3R.

3.3 PTH3R 蛋白编码区序列结构分析

基于 NCBI 公布的 PTH3R 预测序列设计基因特异性引物,我们成功从珍珠鸟和家鸡大脑组织中克隆到包含完整 PTH3R 蛋白质编码区的 cDNA 序列. 珍珠鸟 PTH3R 的 cDNA 编码含 520 个氨基酸残基的蛋白质,家鸡 PTH3R 的 cDNA 编码含 543 个氨基酸残基的蛋白质. 本文克隆到的珍珠鸟和家鸡的 PTH3R 蛋白一级结构氨基酸序列一致性达 75.51%, 与已鉴定到的斑马鱼 (*Danio rerio*) PTH3R 的氨基酸序列 (GenBank 登录号:

AAF01266.2) 一致性达 61.12%. 珍珠鸟 PTH3R 的剪接变体 zPTH3R-v1 cDNA 编码 488 个氨基酸残基,与 zPTH3R-w 的氨基酸序列一致性达 93.85%.

对氨基酸序列进行分析发现,珍珠鸟和家鸡 PTH3R 蛋白一级结构氨基酸序列中均含有信号肽序列,6 个保守的半胱氨酸,两个保守的 N-连接糖基化位点,7 个 α -螺旋构成的 G-蛋白耦联受体家族典型的七次跨膜区 (图 3).

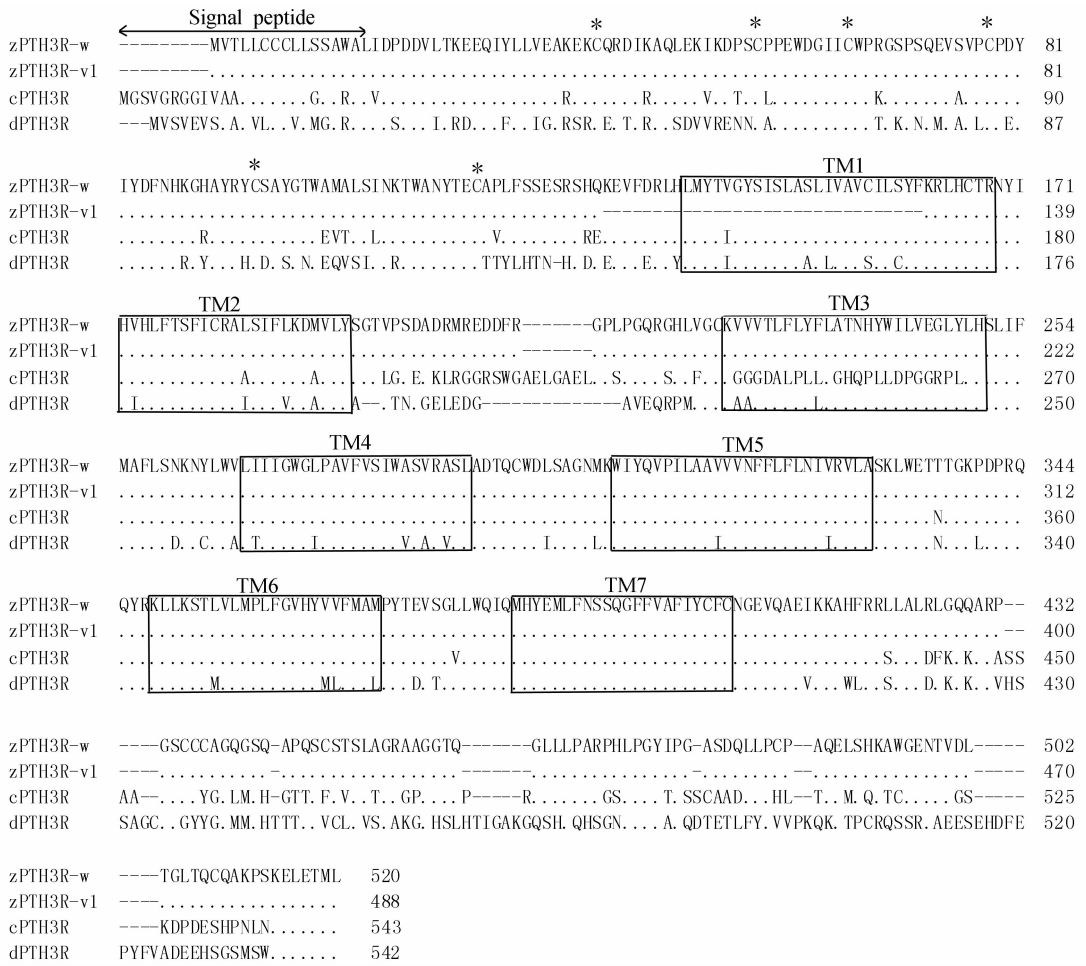


图 3 珍珠鸟和家鸡 PTH3R 序列对比分析

信号肽序列用双箭头标示; 六个保守的半胱氨酸残基用 * 号标识; 七次跨膜区用灰色实线框标记; N-连接糖基化位点用虚线框标出。zPTH3R-w 及 zPTH3R-v1 代表本文克隆到的珍珠鸟 PTH3R 及其剪接变体肽链序列; cPTH3R 代表本文克隆到的家鸡 PTH3R 肽链序列; dPTH3R 代表已鉴定到的斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 PTH3R 肽链序列 (Gene Bank 登录号: AF132085. 2)。

Fig. 3 Sequence alignment of the PTH3Rs among species

The signal peptide sequence is marked by an arrow and the six conserved cysteine residues by “*”. The predicted seven transmembrane domains (TM) are boxed. The conserved N-glycosylation site is annotated by dashed boxed. zPTH3R-w, full-length zebra finch PTH3R; zPTH3R-v1, zebra finch PTH3R variant 1; cPTH3R, chicken PTH3R; dPTH3R, zebrafish (*Danio rerio*) PTH3R (Access no.: AF132085. 2).

3.4 PTH3R 蛋白三维结构建模

经过多重序列比对分析, 发现珍珠鸟和家鸡 PTH3R 蛋白结构相似度很高, 在 N-末端 (N-terminal region, N-TERM) 区均含有 20 余个氨基酸组成的信号肽序列、三个保守的二硫键和两个 (螺旋等特征性结构, 并预测到了两个可能的 N-糖基化位点; 均具有 GPCRs 典型的七次跨膜区 (Transmembrane domains, TM) 结构; 均在 C-末端 (C-terminal region, C-TERM) 具有一个保守的 (螺旋区, 并预测到了磷酸化位点 (图 3, 图 4a/c)。剪接变体 zPTH3R-蛋白结构与 zPTH3R 相似, 但缺失了 TM1, 仅六次跨膜 (图 3, 图 4e)。通过同源建模的方法, 在 SWISS-MODEL 网站上模拟了珍珠鸟和家鸡的 PTH3R 蛋

白三维结构 (图 3, 图 4b/d/f)。

3.5 PTH3R 及其变体 PTH3R-v1 组织表达分析

如前所述, 剪切变体 zPTH3R-v1 缺失了第一次跨膜区, 这对于 GPCRs 家族来说是较为罕见的, 因此, 针对 zPTH3R-w 和 zPTH3R-v1 选择了两对引物以检测其在珍珠鸟成体多种组织中的表达情况, 其中引物对 zPTH3R-rU1/ rL1 用于检测 zPTH3R-w 的组织分布, 引物对 zPTH3R-rU1/ L2 用于检测 zPTH3R-v1 的组织分布。

如图 5 所示, 在珍珠鸟性成熟个体外周组织中, 除肾脏、甲状腺和胰腺之外, 均检测到了 zPTH3R-w 的表达, 其中肝脏中可能还存在有新的剪切方式; 而在中枢神经系统中, 除脊髓和垂体

外,也都检测到了 zPTH3R-w 的高表达。有趣的是, zPTH3R-v1 和 zPTH3R-w 的组织表达分布情况不尽相同:在所有外周组织中,均检测到了 zPTH3R-v1 的表达,且在肺、卵巢、脾脏中可能还

存在有新的剪切形式;在中枢神经系统中,除小脑外均检测到了 zPTH3R-v1 的高表达,且在甲状腺和垂体中可能还存在有新的剪切形式。

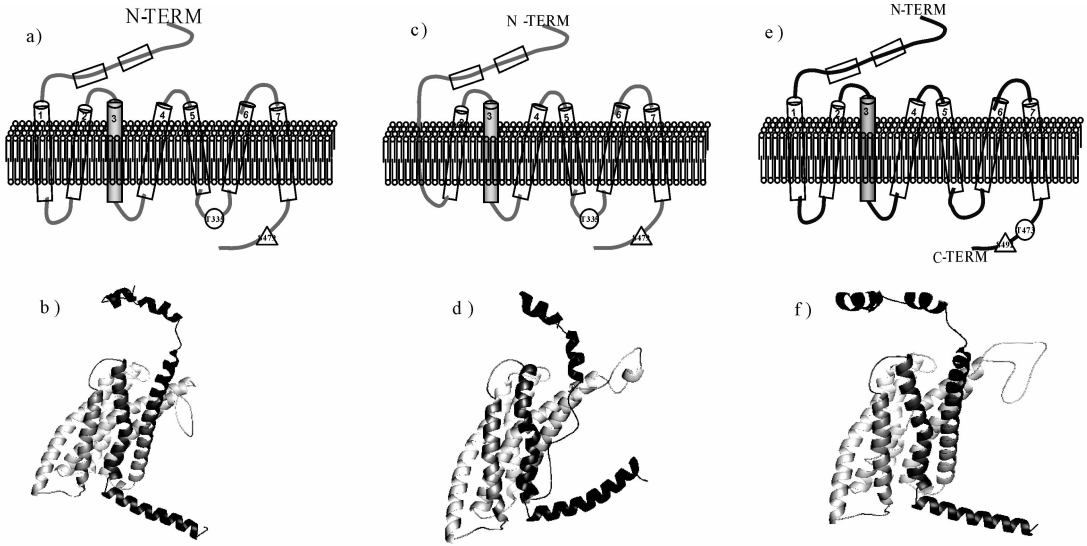


图 4 珍珠鸟和家鸡 PTH3R 蛋白结构

a, b) 家鸡 PTH3R 结构示意图; c, d) 珍珠鸟 PTH3R 剪切变体三维结构模式图。箭头所示为缺失的第一跨膜区(TM1); e, f) 珍珠鸟 PTH3R 三维结构模式图;

Fig. 4 Protein structure of the cPTH3R and zPTH3R

a, b) 2D and 3D view of chicken PTH3R (cPTH3R). c, d) 2D and 3D view of zebra finch PTH3R-v1 (zPTH3R-v1). The arrows show the deleted 1st transmembrane domain (TM1). e, f) 2D and 3D view of zebra finch PTH3R (zPTH3R-w).

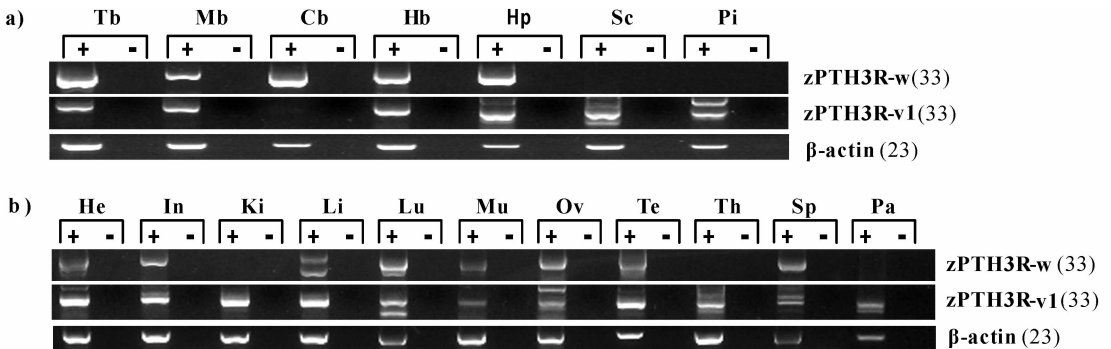


图 5 RT-PCR 检测 zPTH3R-w 及 zPTH3R-v1 在珍珠鸟成体组织中的表达分布

a) zPTH3R-w 及 zPTH3R-v1 在珍珠鸟中枢神经系统中的表达分布,包括大脑(Tb)、中脑(Mb)、小脑(Cb)、后脑(Hb)、下丘脑(Hp)、脊髓(Sc)、垂体(Pi); b) zPTH3R-w 及 zPTH3R-v1 在珍珠鸟外周组织中的表达分布,包括心脏(He)、肠(In)、肾脏(Ki)、肝脏(Li)、肺(Lu)、肌肉(Mu)、卵巢(Ov)、精巢(Te)、甲状腺(Th)、脾脏(Sp)及胰腺(Pa)中的表达分布情况。括号中的数字表示所用的 PCR 循环数,“-”表示没有扩增条带的对照组。以 β -actin 基因表达作为内参。

Fig. 5 RT-PCR detection of zPTH3R-w and zPTH3R-v1 mRNA transcripts in adult zebra finch tissues

a) RT-PCR detection of zPTH3R-w and zPTH3R-v1 mRNA transcripts in adult zebra finch central nervous system including telencephalon (Tb), midbrain (Mb), cerebellum (Cb), hindbrain (Hb), hypothalamus (Hp), pituitary (Pi) and spinal cord (Sc); b) RT-PCR detection of zPTH3R-w and zPTH3R-v1 mRNA transcripts in adult zebra finch peripheral tissues including heart (He), small intestine (In), kidney (Ki), liver (Li), lung (Lu), muscle (Mu), ovary (Ov), testis (Te), thyroid gland (Th), spleen (Sp) and pancreas (Pa). Numbers in brackets indicate the PCR cycle used. No PCR band was detected in all negative controls (-). β -actin was amplified as internal control.

4 讨论

甲状旁腺激素受体家族介导甲状旁腺激素对

钙稳态的调控和骨的代谢平衡以及多种组织的发育调控。作为家族新成员的 PTH3R,在模式生物珍珠鸟和家鸡中都被克隆鉴定到,且序列一致性高

达 80.96%, 预示 PTH3R 在鸟类基因组中是比较保守的. 基因组进化研究指出, 脊椎动物 PTH3R 是 PTH1R 的同系物, 是基因组复制的结果, 与 PTH1R 具有极高同源性^[3,4].

PTH3R 属于 B 族 G 蛋白偶联受体 (GPCR)^[6, 21]. 该族受体的一般结构特征为 N 末端较长且相对保守, 包含二硫键形成位点, 可能存在胞外(螺旋等, 与受体结合时疏水中心的形成和构象变化有关^[4-6]. PTH3R N-末端胞外域的(螺旋, 可能与单体 PTH3R 激活 G 蛋白有关, 但该激活机制有待确认^[22], 而 C-末端胞内域的(螺旋有助于 PTH3R 结构的稳定^[1-3]. 本文克隆到的 cPTH3R、zPTH3R、zPTH3R-v1 均含有 6 个保守的半胱氨酸位点, 同时也预测到了 2 个 N-末端胞外(螺旋(图 4b/d/f).

在鱼类中, PTH3R 能激活腺苷酸环化酶/蛋白激酶 A (adenylate cyclase/protein kinase A, AC/PKA) 信号通路^[12]. 本文通过分析, 预测到家鸡 PTH3R 蛋白在 C-末端有一个蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 特异磷酸化位点 (S492) 和一个蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 特异磷酸化位点 (T473) (图 4a). 珍珠鸟 PTH3R 蛋白在 TM5 和 TM6 之间有一个潜在的 PKC 激酶特异磷酸化位点 (T336), 在 C-末端 PKA 激酶特异磷酸化位点 (S335) (图 4c). 这意味着受体激活后, PKA 和/或 PKC 又可调节受体的磷酸化, 从而修饰其信号转导功能. 在本文后续研究工作中, 将通过实验来进一步验证.

本文克隆到的珍珠鸟 PTH3R 的剪接变体 zPTH3R-v1, 与 zPTH3R-w 相比缺失了第 3 外显子区序列, 从而导致涉及第 1 跨膜结构域的 K130 和 F161 之间 32 个氨基酸的丢失, 使得 zPTH3R-v1 蛋白仅剩 6 个跨膜结构域. 这对于 GPCRs 家族来说是较为罕见的, 因此 zPTH3R-v1 存在的意义和功能还有待进一步探讨. 一般认为, TM1 与配基的结合及受体的构象活化过程有关.

目前对鸟类 PTH3R 的组织表达情况了解甚少. 有研究发现家鸡 PTH3R 在胚胎早期表达量较高并表达于幼体的多个组织, 而在成体中仅在肠、肺、肝和软骨组织中能检测到^[3]. 另有研究者称仅在硬骨鱼肾脏组织中检测到 PTH3R 的表达^[20]. 我们在珍珠鸟成熟个体的除肾脏、甲状腺和胰腺之外的外周组织和除脊髓和垂体之外的中枢神经系统中, 均检测到了 zPTH3R-w 的表达, 其中肝脏中

可能还存在有新的剪切变体. 而 zPTH3R-v1 在所有外周组织和除小脑之外的中枢神经系统中, 均检测到了 zPTH3R-v1 的表达, 且在肺、卵巢、脾脏、甲状腺和垂体中可能还存在有新的剪切形式. 这与其他研究者的研究结果有较大差异. 因此, 在本文后续研究工作中, 将对 PTH3R 在珍珠鸟各发育阶段的组织表达情况进行探讨, 以明确其在发育中的作用, 同时也将对其它新的剪接形式进行功能分析.

综上, 通过对珍珠鸟和家鸡 PTH3R 编码区序列的克隆, 分析了 PTH3R 的基因结构和蛋白结构, 并对珍珠鸟 PTH3R 的组织表达情况有了基本了解, 这为我们进一步研究 PTH3R 在鸟类中的作用奠定基础.

参考文献:

- [1] Gensure R C, Gardella T J, Jüppner H. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005, 328 (3): 666.
- [2] Pinheiro P L C, Cardoso J C R, Gomes A S, *et al.* Gene structure, transcripts and calciotropic effects of the PTH family of peptides in *Xenopus* and chicken[J]. *BMC evolutionary biology*, 2010, 10 (1): 373.
- [3] Pinheiro P L C, Cardoso J C R, Power D M, *et al.* Functional characterization and evolution of PTH/PTHrP receptors: insights from the chicken[J]. *BMC evolutionary biology*, 2012, 12(1): 110.
- [4] Gardella T J, Jüppner H. Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2001, 12(5): 210.
- [5] Jüppner H, Abou-Samra A B, Freeman M, *et al.* A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide[J]. *Science*, 1991, 254(5034): 1024.
- [6] Harmar A J. Family-B G-protein-coupled receptors [J]. *Genome Biol*, 2001, 2(12): 3013.1.
- [7] Canario A V M, Rotllant J, Fuentes J, *et al.* Novel bioactive parathyroid hormone and related peptides in teleost fish [J]. *FEBS letters*, 2006, 580 (1): 291.
- [8] Zhao Q, Brauer P R, Xiao L, *et al.* Expression of parathyroid hormone - related peptide (PTHrP) and its receptor (PTH1R) during the histogenesis of cartilage and bone in the chicken mandibular

- process [J]. *Journal of anatomy*, 2002, 201(2): 137.
- [9] Cardoso J C R, Pinto V C, Vieira F A, *et al.* Evolution of secretin family GPCR members in the metazoa[J]. *BMC evolutionary biology*, 2006, 6(1): 108.
- [10] Schneider H, Feyen J H M, Seuwen K, *et al.* Cloning and functional expression of a human parathyroid hormone receptor [J]. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 1993, 246(2): 149.
- [11] Hang X M, Power D, Flik G, *et al.* Measurement of PTHrP, PTHR1, and CaSR expression levels in tissues of sea bream (*Sparus aurata*) using quantitative PCR[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, 1040(1): 340.
- [12] Rotllant J, Redruello B, Guerreiro P M, *et al.* Calcium mobilization from fish scales is mediated by parathyroid hormone related protein via the parathyroid hormone type 1 receptor[J]. *Regulatory peptides*, 2005, 132(1): 33.
- [13] Usdin T B, Wang T, Hoare S R J, *et al.* New members of the parathyroid hormone/parathyroid hormone receptor family: the parathyroid hormone 2 receptor and tuberoinfundibular peptide of 39 residues[J]. *Frontiers in neuroendocrinology*, 2000, 21(4): 349.
- [14] Usdin T B, Gruber C, Bonner T I. Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(26): 15455.
- [15] Rotllant J, Guerreiro P M, Redruello B, *et al.* Ligand binding and signalling pathways of PTH receptors in sea bream (*Sparus auratus*) enterocytes[J]. *Cell and tissue research*, 2006, 323(2): 333.
- [16] Rubin D A, Jüppner H. Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(40): 28185.
- [17] Gensure R, Juppner H. Parathyroid hormone without parathyroid glands [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(2): 544.
- [18] Bergwitz C, Klein P, Kohno H, *et al.* Identification, Functional Characterization, and Developmental Expression of Two Nonallelic Parathyroid Hormone (PTH)/PTH-Related Peptide Receptor Isoforms in *Xenopus laevis* (Daudin) 1[J]. *Endocrinology*, 1998, 139(2): 723.
- [19] Cormier S, Delezoide A L, Benoist-Lasselin C, *et al.* Parathyroid hormone receptor type 1/Indian hedgehog expression is preserved in the growth plate of human fetuses affected with fibroblast growth factor receptor type 3 activating mutations [J]. *The American journal of pathology*, 2002, 161(4): 1325.
- [20] Rotllant J, Guerreiro P M, Anjos L, *et al.* Stimulation of cortisol release by the N terminus of teleost parathyroid hormone-related protein in interrenal cells in vitro [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(1): 71.
- [21] 徐雪, 张剑南, 张耀荣, 王亚军, 李娟. 猪 GPR84 基因克隆和组织表达图谱分析[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2014, 51(5): 1079.
- [22] Pioszak A A, Harikumar K G, Parker N R, *et al.* Dimeric arrangement of the parathyroid hormone receptor and a structural mechanism for ligand-induced dissociation[J]. *Journal of biological chemistry*, 2010, 285(16): 12435.